

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE LISBOA

TRABALHO FINAL DO MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Oftalmologia



Amaurose Congénita de Leber: apresentação clínica, genética e novas estratégias terapêuticas

Ana Isabel Saraiva Sabugueiro

Orientador: Prof. Doutor Carlos Marques Neves

Lisboa

Ano lectivo 2013/2014

Resumo

A Amaurose Congénita de Leber representa um conjunto de retinodistrofias graves e raras de estabelecimento precoce. É uma doença clinicamente heterogénea, mas as suas principais características são uma perda de visão grave e precoce, a presença de pupilas amauróticas e nistagmo, assim como a ausência ou marcada redução das respostas eléctricas na electrorretinografia. Foram até hoje identificados 18 genes causadores desta patologia, representando cerca de 70% dos casos estudados.

Actualmente esta doença não tem cura, no entanto, várias estratégias terapêuticas estão em estudo. A estratégia que parece mais promissora é a terapêutica genética cujo objectivo é corrigir os defeitos genéticos através a inoculação de genoma recombinante.

Após vários anos de estudos em animais, foram realizados os primeiros ensaios clínicos de terapêutica genética em humanos. Estes ensaios foram realizados em doentes com mutação no gene *RPE65* e os resultados obtidos foram positivos, tendo-se observado sobretudo uma melhoria da sensibilidade luminosa no olho inoculado e um aumento da capacidade de deambular em ambientes pouco iluminados sem se registarem eventos adversos graves. No entanto, foram reduzidos os ganhos na acuidade visual e não foi possível evitar a degeneração dos fotorreceptores com esta terapêutica, pelo que ainda é necessária mais investigação nesta área.

Abstract

Leber Congenital Amaurosis represents a group of rare early-onset retinal dystrophies. Despite being clinically heterogenic, its principal features are severe early-onset vision loss, presence of amaurotic pupils and nistagmus as well as the absence or severe reduction of electrical responses on electroretinography. As of today, 18 genes have been associated with this pathology, representing 70% of the studied cases of the disease.

Although several therapeutic strategies are being studied, there is no cure for this pathology. The most promising strategy appears to be genetic therapy which aims to correct genetic defects through the inoculation of recombinant genome.

After many years of studying genetic therapy in animal models, the first clinical trials were executed in humans with mutation of the *RPE65* gene. The results were

positive, with gains in light sensitivity and in the capacity to navigate in low light environments. However, there was little improvement in visual acuity and the degenerations of the photoreceptor cells was not avoided by this therapeutic hence the need for further investigation in this area.

Introdução

A Amaurose Congénita de Leber (ACL) representa um grupo de distrofias retinianas hereditárias graves¹⁻⁴ e resulta numa perda de visão bilateral marcada antes do primeiro ano de vida.^{2,3,5}

Em 1869, Theodor Leber descreveu pela primeira vez esta condição, considerando-a como um tipo de retinite pigmentar congénita,³ que apresenta uma grande componente hereditária e provoca cegueira quase completa ao nascer.⁵ Em 1954, Franceschetti e Dieterle descreveram como característica da ACL a ausência ou marcada redução dos sinais mensuráveis na electrorretinografia (ERG), diferenciando-a assim das outras distrofias retinianas.⁵

Os principais genes associados a esta patologia são o *RPE65*, o *CEP290*, o *GUCY2D*, e o *CRB1*. No entanto, já foram identificados até ao momento 18 genes^{4,6} que são responsáveis por 70% dos casos estudados de ACL.⁶

Apresentação Clínica e Diagnóstico

A ACL representa um conjunto de distrofias retinianas, não apresentando sinais de doença sistémica e possui um padrão de hereditariedade maioritariamente autossómico recessivo.³⁻⁵ Estas distrofias caracterizam-se pela formação embriogénica anormal dos fotorreceptores que resulta na aplasia destas células, ou na disfunção dos fotorreceptores ou na sua degeneração progressiva.⁷

A prevalência da ACL na população geral varia entre 1/81000 e 1/30000. No entanto, representa cerca de 5% de todas as retinopatias hereditárias e aproximadamente 20% das crianças que frequentam escolas para cegos sofrem desta patologia.³⁻⁵

Embora não exista consenso na comunidade científica quanto aos critérios de diagnóstico,^{3,4,7} a perda de visão precoce e grave, o nistagmo sensorial, as pupilas amauróticas e a ausência ou redução marcada dos sinais eléctricos na ERG são características altamente sugestivas de ACL.^{3,7}

Os indivíduos afectados apresentam-se logo ao nascer com um grave défice visual.⁴ Habitualmente, este défice é detectado por volta das seis semanas, quando os pais notam oscilações no movimento dos olhos ou ausência de fixação.³

Alguns doentes possuem uma capacidade visual que lhes permite deambular ou mesmo ler na idade adulta. No entanto, outros perdem a capacidade de ler com a visão após alguns anos ou mesmo nunca tiveram essa capacidade, lendo apenas em Braille.⁵

Normalmente a acuidade visual varia de 20/200 à ausência total de percepção luminosa,³ representando esta última um terço dos doentes.⁴ É raro haver uma acuidade visual superior a 20/400.⁴

Enquanto a maioria dos doentes tem uma função visual estável ou esta piora lentamente,^{3,4} alguns apresentam uma ligeira melhoria de função visual nos estadios mais iniciais da doença.⁴ Foram relatados casos de doentes com mutações nos genes *CBR1*, *LRAT* e *RPE65* com uma acuidade visual de 20/50 ou superior, contudo esses valores tendem a não permanecer estáveis.³ Em doentes com a mutação c.529delG no gene *CRX*, foi também relatada uma melhoria marcada e espontânea da função visual desde o nascimento até aos 11 anos.⁸

Outros achados clínicos frequentes são a alteração da aparência da retina, a alta hipermetropia, o sinal óculo-digital, a fotofobia, a nictalopia, o queratocone e a catarata.^{3-5,9}

Os doentes apresentam vários tipos de lesão retiniana, sendo que estas não são diagnósticas de ACL nem específicas de certos subtipos genéticos.⁴

Inicialmente, a aparência da retina é essencialmente normal, todavia uma variada gama de anomalias como a atenuação moderada da vascularização da retina, o pseudopapiledema do disco óptico, a maculopatia, a pigmentação tipo “espícula óssea”, a pigmentação sal e pimenta, as manchas amarelas confluentes periféricas, as manchas brancas retinianas, a retina com aspecto marmorizado, o epitélio pigmentar paraarteriolar preservado e a reacção de Coats podem desenvolver-se posteriormente. Outra lesão que também surge é o coloboma macular, que neste caso não se trata de um verdadeiro coloboma, mas reflecte uma discreta degeneração e atrofia corio-retiniana centrada sobre a fóvea.^{3,4,9}

Os erros de refração altos são frequentes em doentes com ACL e a maioria tem alta hipermetropia (>5 dioptrias),³⁻⁵ sugerindo que a cegueira congénita afecta significativamente o processo de emetropização^{3,4} ou que os genes retinianos alterados também têm um papel importante na determinação do tamanho do olho na criança.³

O sinal óculo-digital de Franceschetti é um fenómeno que consiste em pressionar o globo ocular para dentro da órbita à procura de eventuais sensações luminosas. Este

sinal é bastante característico da ACL, mas não é patognomónico desta doença. O constante pressionar do globo ocular pode resultar em atrofia do tecido adiposo orbital, podendo a endoftalmia ser uma característica facial proeminente em doentes com ACL.^{3,4}

O queratocone associado à ACL pode diminuir ainda mais a função visual. Desconhece-se a sua etiologia, podendo ser uma característica intrínseca da ACL ou resultar do repetitivo trauma da córnea, causado pelo sinal óculo-digital.^{3,4}

Há vários estudos que sugerem a existência de uma relação entre a ACL e o autismo, o atraso do desenvolvimento neurológico ou a incapacidade mental, embora essa relação não tenha sido inequivocamente comprovada.^{3,4}

Assim, o diagnóstico de ACL é baseado na clínica, devendo-se procurar os sinais e sintomas característicos da doença, e na ausência ou diminuição das respostas eléctricas na ERG.¹⁰ É também importante fazer uma revisão de sistemas para excluir doenças sindrómicas que incluam degeneração retiniana e investigar se existem outros membros da família afectados.⁹ Certos achados clínicos podem sugerir um determinado genótipo, no entanto, para chegar a um diagnóstico definitivo deve-se recorrer a testes genéticos para identificar a mutação subjacente.⁹

Diagnóstico Diferencial

Existem várias doenças que se confundem com a ACL, tendo estudos de reavaliação retrospectivos mostrado muitos erros no que diz respeito ao diagnóstico de ACL.³

Há cinco doenças oftalmológicas não sindrómicas que se confundem com a ACL e precisam de ser excluídas no diagnóstico diferencial. Estas doenças são o albinismo, a hipoplasia do nervo óptico, a acromatopsia completa e incompleta e a cegueira noturna estacionária congénita.³⁻⁵ Todas elas apresentam clinicamente perda de visão precoce, nistagmo, pouca fixação e uma aparência retiniana normal, especialmente nos primeiros anos.^{3-5,7} Embora apresentem algumas características diferentes, como por exemplo a ACL ser normalmente acompanhada de alta hipermetropia e a cegueira noturna estacionária congénita ser normalmente acompanhada de alta miopia, o diagnóstico diferencial entre elas é feito sobretudo através da realização da ERG.⁷

A ERG mede a quantidade de resposta eléctrica da retina inteira a um estímulo. Os resultados podem ser separados em componentes fotópico (cone) e escotópico (bastonete) e permitem também distinguir a função do primeiro neurónio (onda-a dos fotorreceptores) da função dos neurónios de segunda ordem (onda-b das células bipolares e células de Müller).^{3,9}

As respostas na ERG são distintas entre cada uma destas patologias. Como já foi referido, na ACL as respostas eléctricas, quer componente fotópico quer componente escotópico, estão muito diminuídas ou ausentes. No albinismo estas respostas estão muitas vezes aumentadas. Nas acromatopsias completa e incompleta é apenas o componente fotópico que se encontra diminuído ou ausente, podendo o componente escotópico ser normal. Na cegueira noturna estacionária congénita ocorre o contrário, estando o componente escotópico diminuído ou ausente e o componente fotópico pode estar normal.⁷

Outra patologia que é importante distinguir da ACL é a retinite pigmentar. Embora estas patologias apresentem uma clínica um pouco diferente, representando dois espectros das distrofias da retina, podem ser causadas por mutações nos mesmos genes (ex. *RPE65*, *CRX*, *TULP1*).¹¹ A retinite pigmentar tem um início mais tardio e os doentes apresentam uma acuidade visual central relativamente boa, nictalopia e ausência de nistagmo.¹⁰ Na ERG destes doentes, o componente fotópico é poupado, pelo menos nas fases iniciais da doença.¹¹

Existem ainda doenças sindrómicas que se podem confundir com a ACL por inicialmente apresentarem cegueira congénita sem sinais ou sintomas de doença sistémica. As mais importantes são o Síndrome de Senior-Loken, o Síndrome de Joubert, o Síndrome de Alström e a Doença de Batten.³⁻⁵ O Síndrome de Senior-Loken caracteriza-se por uma distrofia retiniana e acompanhada de nefronoptise. No Síndrome de Joubert, os doentes apresentam hipoplasia do vermis cerebelar, que é acompanhada de sintomas neurológicos incluindo dificuldades respiratórias neonatais e atraso no desenvolvimento. Estes doentes também podem apresentar um fenótipo ocular tipo ACL e nefronoptise.^{7,11,12} A Doença de Batten é caracterizada por distrofia retiniana e degeneração neurológica significativa. No caso do Síndrome de Alström, os doentes apresentam uma distrofia retiniana precoce e nistagmo, desenvolvendo mais tarde diabetes mellitus, cardiomiopatia, surdez neuro-sensorial e obesidade.^{7,10,11}

Genética

Os genes que causam ACL têm sido identificados por vários métodos, incluindo a análise “linkage”, a abordagem por gene candidato, o mapeamento “identity-by-descent” e mais recentemente por sequenciação de exomas.^{3,6}

Actualmente, foram identificadas mutações em 18 genes responsáveis pela ACL,^{4,6} que são responsáveis por 70% dos casos estudados,⁶ e o padrão de hereditariedade é na maioria dos casos autossómico recessivo. Contudo, uma mutação específica no gene *CRX* conduz a um padrão autossómico dominante.⁴

Os genes mais frequentemente mutados são o *RPE65* (3-16%), o *CEP290* (15%), o *CRB1* (10%), e o *GUCY2D* (6-12%),^{4,6} sendo que 70% das mutações deste são originárias de países mediterrânicos.¹²

Apesar de existir uma grande heterogeneidade fenotípica e de não haver características patognomónicas das várias mutações, parece existir uma correlação entre a apresentação clínica e os diferentes genótipos.^{3,9}

GUCY2D (LCA1)

O gene *GUCY2D* (Guanylate Cyclase 2D) codifica a guanilil ciclase da membrana retiniana (RetGC1), um componente chave do mecanismo de fototransdução nos fotorreceptores, responsável por re-sintetizar GMPc.¹³ Na retina humana é encontrado sobretudo nos segmentos externos dos fotorreceptores. Os efeitos da sua deficiência na estrutura dos fotorreceptores são ainda desconhecidos.¹⁴

Os doentes com esta mutação caracterizam-se clinicamente por fotofobia, hipermetropia alta e função visual baixa mas estável, sem sinais de qualquer melhoria.⁴

Foi realizado um estudo histopatológico *post-mortem* num doente com 11,5 anos que revelou uma manutenção relevante de cones e bastonetes, indicando uma possibilidade terapêutica.¹²

RPE65 (LCA2)

O gene *RPE65* (Retinal Pigment Epithelium-Specific Protein, 65-KD) codifica uma proteína necessária para a actividade da isomerohidrolase do epitélio pigmentar retiniano.² Esta enzima é responsável pela conversão de ésteres all-*trans*-retinal em 11-*cis*-retinal. O pigmento fotossensível, presente nas membranas dos segmentos externos dos fotorreceptores, possui dois componentes, um pigmento carotenóide e uma proteína

opsina (escotopsina nos bastonetes e fotopsina nos cones).¹⁵ Assim sendo, a ausência de 11-*cis*-retinal impede a fototransdução nos fotorreceptores.²

Caracteriza-se clinicamente por uma perda moderada de visão na infância que progride para cegueira completa a meio da idade adulta ou ainda mais tardiamente. Uma das características únicas da LCA2 é a preservação das células retinianas mesmo nos casos de grande déficit visual.^{2,9}

SPATA7 (LCA3),

O gene *SPATA7* (Spermatogenesis-Associated Protein 7) é expresso na camada ganglionar, na camada nuclear interna e nos segmentos internos dos fotorreceptores da retina de ratinhos adultos, nos espermátócitos humanos e no cérebro. A sua função na retina ainda não é conhecida.¹⁶

A retinopatia associada a mutações neste gene apresenta clinicamente uma precoce e extensa atrofia retiniana periférica com envolvimento foveal variável.¹²

AIPL1 (LCA4)

A função da proteína codificada pelo gene *AIPL1* (Arylhydrocarbon-Interacting Receptor Protein-Like) ainda não é conhecida, no entanto, foi sugerido que desempenha um papel importante no desenvolvimento dos fotorreceptores e na farnesilação de proteínas.^{4,17}

Inicialmente o gene *AIPL1* é expresso na retina central e periférica, coincidindo com as áreas de desenvolvimento dos fotorreceptores. Embora se pensasse que nos adultos esta expressão se restringia aos bastonetes, foi demonstrada a sua expressão em cones de roedores adultos.^{3,4,17}

Clinicamente, os doentes apresentam uma função visual que varia entre uma acuidade visual de 20/200 à percepção luminosa, apresentando maculopatia e retinopatia tipo “espícula óssea” assim como queratocone e catarata.^{4,17} A gravidade da perda de visão em doentes com ACL provocada por mutação em *AIPL1* parece ser semelhante à provocada por mutação no gene *GUCY2D*.⁴

A tomografia de coerência óptica (OCT) revela perda grave da espessura da retina externa na mácula, desorganização lamelar e aumento da espessura da porção interna da retina.¹⁷

A ERG caracteriza-se por respostas escotópicas insensíveis lentas (SISR – slow insensitive scotopic responses). Se este achado estiver presente na ERG deve-se suspeitar deste genótipo.^{4,17}

LCA5 (LCA5)

O gene *LCA5* codifica a proteína lebercilina, uma proteína ciliar expressa nos microtúbulos, centrossomos e cílios primários. Apesar da sua expressão alargada, o fenótipo da doença restringe-se à retina e não causa ciliopatia sistémica.⁶

Nos fotorreceptores, a lebercilina localiza-se nos cílios conectores, interagindo fisicamente com várias proteínas de transporte intraflagelar. Assim sendo, a mutação de *LCA5* perturba a ligação entre a lebercilina e a maquinaria do transporte intraflagelar, causando um transporte ciliar defeituoso entre os segmentos interno e externo dos fotorreceptores.⁶

Doentes com esta mutação aparentam ter fotorreceptores poupados, maioritariamente na região macular, adjacentes a uma retina desorganizada.⁴

RPGRIP1 (LCA6)

O gene *RPGRIP1* é expresso nos neurónios amácrinos, fotorreceptores e, em menor quantidade, em muitos outros tecidos oculares. Estudos *knock-out* indicam que o gene *RPGRIP1* é necessário para a morfogénese dos discos do segmento externo dos fotorreceptores e tem um papel importante na formação do seu segmento externo, especialmente nos bastonetes.¹⁸

O *RPGRIP1* sofre múltiplos *splicings* o que leva à existência de muitas isoformas que parecem ter diferentes funções. É também um componente da rede proteica de cílios, mas os detalhes sobre a sua função e interacção com outras proteínas ainda não são conhecidos.¹⁸

A ACL causada por mutações neste gene caracteriza-se clinicamente por fotofobia precoce, hipermetropia com menos de sete dioptrias e acuidade visual que varia entre 20/400 à contagem de dedos.⁴

CRX (LCA7)

O *CRX* (Cone-Rod Homeobox Containing Gene) codifica um factor de transcrição membro da família Otx. É expresso nos pinealócitos na glândula pineal,

onde regula a expressão de genes envolvidos na síntese da hormona circadiana melatonina em ratinhos. Na retina dos mamíferos este gene é essencial para o desenvolvimento dos fotorreceptores e regula a expressão da rede de genes da retina, nomeadamente proteínas do segmento externo dos fotorreceptores como a rodopsina, IRBP, b-PDE e arrestina.^{3,19}

Mutações no gene *CRX* parecem estar associadas a uma função visual estável ou mesmo uma modesta melhoria ao longo do tempo. Deleções de um ou dois pares de bases do gene são responsáveis pelas únicas formas autossómicas dominantes de ACL.⁴

CRB1 (LCA8)

O gene *CRB1* (Homolog of *Drosophila* Crumbs 1) codifica um homólogo da proteína transmembranar Crumbs da *Drosophila*. Na *Drosophila* a proteína Crumbs é necessária para manter a polaridade celular apico-basal e participa na adesão epitelial.^{3,20}

Clinicamente, é comum os doentes apresentarem nictalopia e observar-se no fundo ocular preservação do epitélio pigmentar para-arteriolar, reacção de Coats e, em alguns doentes, atrofia macular.^{4,20}

NMNAT1 (LCA9)

O gene *NMNAT1* (Nicotinamide Mononucleotide Adenylyltransferase 1) codifica uma enzima essencial na síntese de Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD⁺). Apesar da sua importância, o mecanismo pelo qual esta enzima protege contra a neurodegeneração permanece controverso e pouco se sabe sobre a sua função endógena nas células nervosas dos vertebrados.²¹

As mutações neste gene causam degeneração macular rápida, levando a atrofia central e aparência de coloboma macular, assim como uma atrofia do nervo óptico precoce. A ausência destes achados no nascimento e o facto de que estudos realizados na *Drosophila* com *knock-out* do gene *NMNAT* mostrarem que a exposição à luz provoca perda de fotorreceptores, sugere que protecção contra a luz desde o nascimento possa retardar as lesões da retina.²²

CEP290 (LCA10)

O gene *CEP290* (Cilia-Centrosomal Protein 290 kDa) codifica uma proteína centrossomal. Mutações neste gene foram descritas em doentes com ACL e em múltiplas patologias ciliares, nomeadamente Síndrome de Joubert, Síndrome de Senior-Loken e Síndrome de Meckel-Gruber. A função da proteína codificada por este gene e o mecanismo pelo qual as suas mutações actuam não estão esclarecidos.²³

Os doentes apresentam manutenção de uma ilha central de cones disfuncionais, a sobrevida destes cones na idade adulta faz com que se torne um possível alvo de terapêutica genética. Note-se que Boye SE et al. documentaram uma perda precoce dos bastonetes.²⁴

IMPDH1 (LCA11)

O gene *IMPDH1* (Inosine-5-Prime-Monophosphate Dehydrogenase 1) expressa uma enzima envolvida na formação de ácidos nucleicos responsável pela conversão da iosina monofosfato (IMP) em xantina monofosfato (XMP) através da redução de NAD⁺.³

Estudos sugerem que tenha uma função na retina independente da sua actividade enzimática, envolvendo a regulação pós-transcricional do mRNA da rodopsina que poderá explicar a sua degeneração.²⁵

RD3 (LCA12)

O gene *RD3* (Homolog of Mouse Retinal Degeneration 3) codifica uma proteína expressa em quantidade significativa na retina, especialmente nos fotorreceptores, e que se liga às guanilato ciclase 1 e 2. Esta interacção temporária faz parte do mecanismo de translocação das guanilato ciclase até ao segmento externo dos fotorreceptores e inibe a sua actividade enzimática basal. As gualinato ciclase 1 e 2 têm um papel essencial na fototransdução pois catalisam a síntese do segundo mensageiro GMPc. Embora estudos provem a importância do *RD3* na função e sobrevivência dos fotorreceptores, o mecanismo que induz a sua degeneração permanece desconhecido.²⁶

RDH12 (LCA13)

A expressão do gene *RDH12* (all-*trans* and all-*cis* Retinol Dehydrogenase) é maior na retina, localizando-se no segmento interno dos fotorreceptores. Pensava-se que

era responsável pela conversão da vitamina A (*all-trans*-retinol) em *11-cis*-retinal durante a regeneração dos pigmentos visuais. No entanto, em modelos murinos, a disrupção deste gene não causa nem distrofia da retina nem afecta os níveis de retinóides *all-trans* e *11-cis*. Assim, foi proposto que tivesse como função proteger a retina do excesso de *all-trans*-retinal num contexto de iluminação contínua, havendo alguma evidência, na retina de ratinhos, do seu envolvimento no processo de desintoxicação de 4-hidroxinonenal nos fotorreceptores.^{3,27}

A doença apresenta uma evolução progressiva e a observação seriada do fundo ocular mostra retinopatia pigmentar grave, atrofia macular e atenuação vascular. A ERG revela perda de função grave e generalizada dos cones e bastonetes.²⁷

LRAT (LCA14)

O gene *LRAT* (Lecithin Retinol Acyl-Transferase) expressa a enzima que converte a vitamina A (*all-trans*-retinol) em ésteres de retinil, retirando assim o retinol da circulação para locais de armazenamento como fígado e epitélio pigmentar da retina.^{3,28}

Mutações em *LRAT* resultam num défice de *11-cis*-retinal e reduz os níveis de pigmento visual funcional.^{3,28} Em ratinhos modelo com *Lrat*^{-/-}, o défice de *11-cis*-retinal leva à perda de fotorreceptores, com degeneração dos cones a ocorrer rapidamente e a degeneração dos bastonetes mais lentamente.²⁹

TULP1 (LCA15)

O gene *TULP1* (Tubby-like protein 1) é expresso predominantemente nos fotorreceptores da retina, sendo mais abundante nos segmentos internos, e em menores quantidades no cérebro e núcleo para-ventricular do hipotálamo.³ Acredita-se que esta proteína esteja envolvida no transporte proteico, nomeadamente de rodopsina do segmento interno para o externo através dos cílios conectores.³⁰

KCNJ13 (LCA16),

O gene *KCNJ13* (Inwardly Rectifying Potassium Channel Subfamily J member 13) codifica a proteína Kir7.1, um canal de potássio “inwardly rectifying” expresso em muitos epitélios transportadores de iões. Também é altamente expresso nos intestinos,

tiróide, plexo coróideu, próstata, rim e retina, onde se localiza predominantemente nas membranas apicais do epitélio pigmentar da retina.³¹

A mutação deste gene foi detectada pela primeira vez em 2011 numa família consanguínea do Médio Oriente com ACL, tendo-se realizado em seguida um estudo para verificar se era uma causa comum de distrofia retiniana autossómica recessiva. Em consequência, foram avaliados 333 doentes não relacionados e sem mutações nos genes conhecidos, dos quais 132 tinham diagnóstico de ACL autossómica recessiva ou de distrofia retiniana precoce. Neste estudo detectou-se uma mutação do gene *KCNJ13* em 35% dos casos, o que sugere que a ausência ou deficiência de Kir7.1 causa ACL.³¹

GDF6 (LCA17)

O *GDF6* (Growth/Differentiation Factor 6) é o principal gene conhecido responsável por especificar o eixo dorso-ventral da retina, colocando-se assim a hipótese deste gene poder estar envolvido em doenças da retina.³²

Num estudo foram analisadas 279 amostras de DNA de doentes diagnosticados com ACL ou retinite pigmentar juvenil sem mutações conhecidas em genes causadores de doença, tendo-se identificado um doente com ACL com heterozigotia composta para 2 mutações *missense*.³² Noutro estudo foram também identificadas três mutações neste gene num grupo de doentes com ACL e retinite pigmentar juvenil.¹²

IQCB1

O gene *IQCB1* (IQ Motif-Containing Protein B1) está presente nos cílios conectores dos fotorreceptores e no cílio primário das células epiteliais renais. Foi sugerido que participa na função ciliar dos fotorreceptores, tal como o gene *RPGR1*.¹²

As mutações neste gene causam Síndrome de Senior-Loken.^{4,12} e a Online Mendelian Inheritance in Man não associa mutações neste gene à ACL.¹² Todavia, vários autores consideram-no como um dos genes causadores desta patologia.^{3,4,6} Num estudo realizado em 276 doentes com ACL, sem mutação conhecida em 8 genes causadores de ACL, foi identificada mutação neste gene em 9 doentes, nenhum dos quais desenvolveu doença renal na primeira década de vida.³³ Assim, os indivíduos com mutações neste gene que ainda não apresentam sinais de doença renal têm diagnóstico de ACL.

Terapêutica

Não há cura para a ACL.^{2,4} Os doentes podem beneficiar da correcção de erros de refacção, de educação específica para invisuais e de instrumentos auxílio.⁴

Estão actualmente em estudo várias estratégias terapêuticas para a ACL, nomeadamente a colocação de implantes para visão artificial, tratamento com derivados da vitamina A e supressão das hormonas tiroideias.³⁴⁻³⁶ Todavia, a estratégia mais estudada e que parece mostrar resultados positivos para uma possível cura no futuro é a terapêutica de aumento de expressão genética.^{1,2,37-39}

A. Implantes para Visão Artificial

Nos casos de distrofia retiniana avançada, além de haver défice de fotorreceptores, a retina também se encontra remodelada.³⁴

No início dos anos 90, alguns grupos surgiram com a ideia de ultrapassar a perda de função da retina ao acoplar sistemas eléctricos ao neurónios ainda funcionantes da via óptica.³⁴

Os implantes retinianos ganharam maior importância desde que foi demonstrado em ensaios que indivíduos completamente cegos adquiriram percepção luminosa com o estímulo eléctrico da superfície interna da retina.³⁴

O conceito geral das próteses visuais consiste na estimulação eléctrica dos neurónios da retina ou outros da via óptica, com o intuito de modificar o seu potencial de membrana, ou de levar os neurónios a disparar potenciais como se tivessem recebido o impulso pela via normal. Estes eléctrodos têm que estar ligados a uma fonte de energia, e por sua vez, esta fonte tem de estar programada de acordo com os impulsos/estímulos recebidos. Estes estímulos são calculados através do processamento de vídeo captado por uma câmara. No casos dos implantes retinianos, os eléctrodos devem ser implantados o mais próximo possível da retina, podendo este objectivo ser alcançado por via epirretiniana, em que os eléctrodos são colocados na superfície interna da retina junto as células ganglionares, ou por via subretiniana, em que os eléctrodos são colocados no espaço subretiniano da retina externa.³⁴

B. Supressão das Hormonas Tiroideias

A sinalização da hormona tiroideia regula a proliferação celular, diferenciação e apoptose e na retina desempenha um papel importante na sua padronização e na

expressão da opsina dos cones. Um estudo mostrou que a administração de um tratamento anti-tiroideu em ratinhos aumentava seis vezes a densidade de cones na retina. Por outro lado, a terapêutica com T3 em ratinhos diminuiu a densidade de cones em cerca de 40%. Esse estudo sugere que a supressão da hormona tiroideia, em ratinhos modelo, tem uma acção protectora sobre os cones.³⁵

C. Terapêutica com Derivados da Vitamina A

Para a manutenção da visão, os vertebrados necessitam da regeneração contínua da vitamina A. Em algumas doenças retinianas, como no caso da ACL, a falha dos mecanismos de regeneração do 11-*cis*-retinal leva a uma diminuição da função visual precoce e um declínio desta ao longo do tempo.³⁶

Em ratinhos com *knock-out* dos genes *RPE65* e *LRAT*, a suplementação com derivados de *cis*-retinóides parece ultrapassar etapas defeituosas do ciclo visual e regenerar os pigmentos visuais.³⁶

Recentemente realizou-se um estudo em doentes com *fundus albipunctatus*, uma forma congénita de cegueira noturna que resulta de mutação no gene *RDH5* necessário para a oxidação de 11-*cis*-retinol a 11-*cis*-retinal, mostrou que a administração suplementos ricos em 9-*cis*-caroteno melhoraram as respostas na ERG e o *score* médio do estudo dos campos visuais.³⁶

D. Terapêutica Genética

A terapêutica genética consiste na correcção de defeitos genéticos através a introdução de genoma exógenos em células alvo^{40,41} e foi realizada pela primeira vez em mamíferos no início da década de 1970, usando o vírus herpes simplex como veículo de transporte do vector para tratar ratinhos com deficiência da enzima timidina cinase.⁴¹

Relativamente às retinopatias hereditárias, estas são candidatas ideais para este tipo de terapêutica pois o olho é um local de fácil inoculação de vectores, é imunologicamente isolado, é facilmente monitorizado por métodos não invasivos e podem ser usadas as abordagens cirúrgicas já usadas no tratamento de outras doenças oculares. Além disso, a maioria destas doenças tem causa monogenética, sendo que muitos dos gene causadores já foram identificados, e estão disponíveis vários modelos animais que imitam as retinopatias hereditárias humanas. Estas características minimizam o risco de complicações na terapêutica genética. Devido a estas vantagens,

já foram feitos alguns ensaios clínicos para a terapêutica genética em doenças da retina, nomeadamente em doentes com ACL.⁴⁰⁻⁴²

1. Vectores e forma de inoculação

Os vectores são normalmente vírus modificados.⁴¹ Foram realizados muitos estudos no passado que evidenciam uma maior eficiência dos vectores virais sobre os não virais para entrega de genes às células alvo. Por outro lado, novos estudos sobre terapêutica genética retiniana com nano-partículas mostram uma melhoria da eficiência quando comparados com estudos anteriores de agentes não víricos.⁴⁰

Os vectores mais estudados na terapêutica genética retiniana são os vírus adeno-associados (AAV). Outros vírus como o lentivirus e adenovirus estão sob investigação.⁴⁰⁻⁴² A utilização dos AAV como vectores apresenta várias vantagens entre elas a de modificar a maioria das células da retina devido à sua grande variedade, e a capacidade de induzirem uma expressão genética eficiente e estável em células em divisão e em células diferenciadas.⁴¹ Além disso, têm um perfil tóxico favorável, não são capazes de se auto-propagar e desencadeiam uma resposta imune mínima.^{40,42} Para a sua utilização na terapêutica genética, os vectores víricos são desenhados sem a capacidade de integração de forma a não causarem mutações estáveis no genoma humano.^{40,42}

Actualmente, inoculam-se os vectores na retina e epitélio pigmentar por via intravítrea e por via subretiniana. Na abordagem intravítrea, o vector é libertado no vítreo, na abordagem subretiniana, a injeção é feita no espaço subretiniano entre os fotorreceptores e o epitélio pigmentar provocando um descolamento reversível da retina. Apesar de ser mais invasiva, a via preferida é a subretiniana, onde existem menos barreiras entrepostas entre as células alvo e o agente terapêutico.⁴⁰

2. Terapêutica genética em modelos animais

Existem vários modelos animais de ACL, nomeadamente roedores, porcos e cães, sendo que uns que surgem na natureza de forma normal e outros são criados com recurso à engenharia genética.³ Até ao momento foram realizados ensaios terapêuticos em modelos animais com mutações em oito dos genes causadores (*GUCY2D*, *RPE65*, *AIPL1*, *RPGRIP1*, *CRX*, *CRB1*, *LRAT* e *RD3*). Os resultados destes estudos mostraram-

se promissores, observando-se melhoria da função visual e da sobrevivência dos fotorreceptores.^{3,43-48}

O cão Pastor de Brie Sueco (Swedish Briard dog) é o modelo animal que melhor mimetiza a ACL pois alguns destes animais possuem uma deleção de quatro pares de bases no gene *RPE65*, apresentando cegueira à nascença e ausência de respostas na ERG de forma semelhante à registada nos seres humanos.^{3,5,49} Utilizando estes cães, foram então realizados vários ensaios clínicos de terapêutica genética tendo sido detectado histologicamente a expressão de 11-*cis*-retinal nos fotorreceptores dos olhos tratados e obtendo-se clinicamente uma melhoria das respostas eléctricas na ERG, dos potenciais evocados e dos reflexos pupilar dos olhos tratados, assim como uma melhoria dos comportamentos dependentes da visão. Estes resultados já eram evidentes duas semanas após o início do tratamento e atingiram o máximo no terceiro mês. A contínua avaliação durante mais de sete anos comprovou a estabilidade da terapêutica.^{3,5,49} Os estudos nestes cães também mostraram que as injeções eram seguras em animais de grande porte e que a eficácia das injeções subretinianas era superior às injeções intravítrias.⁵

Antes de se iniciarem ensaios em humanos, foi testada a segurança do vírus AAV2 em primatas. Nestes estudos não se observou a propagação sistémica do vírus e a expressão do transgene manteve-se por 18 meses, não se detectando toxicidade retiniana.⁵

3. Terapêutica genética em seres humanos

Em 2008, baseado no sucesso dos estudos realizados em modelos animais, foram realizados os primeiros ensaios clínicos de terapêutica genética em seres humanos com ACL, procurando-se corrigir defeitos do gene *RPE65*.^{1,2,37,38}

Bainbridge JW et al. realizaram um ensaio clínico em três jovens adultos com idades compreendidas entre os 17 e os 23 anos com mutações *missense* no gene *RPE65*, inoculando o vector no olho com pior visão. Estes doentes tinham à partida pouca visão ou cegueira em baixa luminosidade desde uma idade precoce mantendo uma função visual limitada em boas condições luminosas.¹

Neste ensaio, não foram detectados eventos adversos graves resultantes da prova terapêutica, assim como não houve disseminação sistémica do vector. Em termos

oculares observou-se uma moderada e auto-limitante inflamação intra-ocular pós-operatória que tipicamente se segue à vitrectomia.¹

Após a injeção houve uma diminuição da acuidade visual nos três doentes, provavelmente associada ao descolamento da retina, tendo esta voltado a valores base ao sexto mês. Um dos doentes registou uma melhoria na função da retina na microcampimetria e na campimetria adaptada ao escuro assim como na mobilidade em ambientes com baixa luminosidade. No entanto, não foram observadas outras melhorias significativas da função visual nem se verificaram alterações na ERG em nenhum dos doentes em comparação com os valores de base.¹

Não foi avaliado se houve aumento da expressão de *RPE65* na retina, pois para tal seria necessário realizar biópsia, e os autores referem não ser claro se a melhoria registada foi mediada por cones ou bastonetes.¹

Maguire AM et al. realizaram também um ensaio clínico em três doentes com idades entre os 19 e os 26 anos e mutação no gene *RPE65*. Num dos doentes foi detectado ao quinto dia, aquando da realização do OCT, um quisto na camada externa da retina na fóvea que evoluiu para um buraco macular ao décimo quarto dia sem que o doente se tivesse apercebido desta alteração, tendo-se mantido inalterado durante o estudo. Os autores do ensaio sugerem que este evento adverso resultou do procedimento cirúrgico. Não foi detectada a disseminação sistémica do vector nem o desencadeamento de resposta imune em nenhum dos doentes. Os três doentes referiram melhoria da visão em ambientes com baixa luminosidade duas semanas após a terapêutica. Na avaliação dos doentes foi registado que todos os olhos injectados se tornaram cerca de três vezes mais sensíveis à luz e verificou-se uma melhoria da acuidade visual e dos reflexos pupilares assim como uma redução do nistagmo. Num dos doentes observou-se também melhoria da acuidade visual no olho não injectado, que pode em parte ser atribuída à redução do nistagmo. Registou-se que a melhoria foi mais rápida até à sexta semana após a injeção com ganhos mais lentos a partir de então, tendo-se os resultados mantido estáveis durante seis meses.²

Os mesmos três doentes foram novamente avaliados um ano e meio após o procedimento não se observando efeitos adversos graves à terapêutica durante este período de tempo, nem expansão do buraco macular provocado num dos doentes no início do ensaio clínico. Na reavaliação, verificou-se ainda que havia melhoria persistente da função visual, tendo sido este fenómeno mais evidente entre o primeiro e

o quarto mês. A melhoria da acuidade visual detectada pode dever-se, em parte, a alterações neuroanatômicas e fisiológicas no cérebro secundárias à estimulação dos neurónios da retina provocada pela transdução do vector. Apesar de tudo, na ERG não se registaram alterações comparando com os valores de base.⁵⁰

Hauswirth WW et al. e Cideciyan AV et al. realizaram um ensaio clínico em três doentes jovem com idades compreendidas entre os 21 e 24 anos, com diagnóstico clínico de ACL e mutação em *RPE65*. Não foram observados efeitos adversos graves resultantes da terapêutica, nem disseminação sistémica do vector. Na avaliação clínica, verificou-se um aumento da sensibilidade luminosa nos três doentes em diferentes graus, tendo sido na sensibilidade adaptada ao escuro que se registaram os maiores ganhos, assim como melhoria dos reflexos pupilares. Todavia, não se verificou melhoria da acuidade visual em nenhum doente até noventa dias após a cirurgia. A avaliação electrofisiológica revelou um aumento da sensibilidade dos bastonetes nas regiões da retina expostas à terapêutica e no doente com melhor resposta terapêutica também se registou um aumento da sensibilidade dos cones.^{37,38}

Foi realizada uma reavaliação dos mesmos três doentes um ano após a terapêutica não se tendo detectado nenhum efeito adverso grave. Ao fim do ano, um dos doentes aumentou significativamente a percepção luminosa, mais evidente em ambientes com baixa luminosidade, assim como maior poder de fixação na retina supratemporal tratada, sugerindo o desenvolvimento de uma pseudo-fóvea.⁵¹

Em 2009 Maguire AM et al. realizaram um ensaio clínico em 12 doentes com idades compreendidas entre os 8 e os 44 anos e ACL associada a mutação em *RPE65*, tendo os doentes sido avaliados durante um período de dois anos. Durante o tempo de estudo, não se registou nenhum efeito adverso grave e nem respostas imunes malignas. Quanto à função visual, todos os indivíduos referiram melhoria da visão em baixa luminosidade ao fim de duas semanas e todas as crianças ganharam a habilidade de navegar num percurso de obstáculos de forma autónoma. Objectivamente, verificou-se uma melhoria dos campos visuais, sobretudo nos doentes mais jovens, dos reflexos pupilares e uma diminuição do nistagmo em todos os indivíduos testados. Observou-se ainda uma melhoria substancial e estável da acuidade visual em sete dos doentes, quatro mantiveram a acuidade visual de base e um deles piorou. Na ERG manteve-se a ausência de respostas eléctricas pelo facto de a área tratada em todos os doentes ser demasiado pequena para gerar grande resposta eléctrica. Na análise dos dados obtidos

com este estudo não foi detectada relação entre dose e efeito terapêutico nem foi encontrada associação entre a idade dos doentes e a melhoria da acuidade visual.³⁹

Cinco dos doentes pertencentes aos ensaios realizados por Maguire et al. foram ainda reavaliados ao fim de três anos, não tendo sido detectados efeitos adversos graves. Além disso a melhoria da função visual e da retina mantiveram-se estáveis, tendo o pico máximo de melhoria ocorrido seis meses após a cirurgia.⁵²

Apesar dos resultados promissores destes ensaios clínicos a terapêutica genética não impede a progressão da degeneração da retina. A medição da camada celular externa da retina, onde se localizam os corpos celulares dos cones e bastonetes, por OCT revela uma progressiva e contínua diminuição da sua espessura três anos após o procedimento.⁵³

Conclusão

A ACL representa um conjunto de distrofias retinianas que provocam uma perda de visão precoce e grave. A sua prevalência na população geral é muito baixa, contudo, 20% das crianças que frequentam escolas para cegos sofrem desta patologia. Embora seja uma doença bastante heterogénea em termos fenotípicos, a ausência ou marcada redução de respostas eléctricas na ERG assim como a ausência de manifestações sistémicas são características que a permitem distinguir de outras doenças que também apresentam uma distrofia retiniana precoce.

Actualmente não existe cura para esta patologia, mas existem várias estratégias terapêuticas em estudo como a colocação de implantes para visão artificial, o tratamento com derivados da vitamina A e a supressão das hormonas tiroideias, tendo todas mostrado bons resultados até ao presente e possibilidades de uso no futuro. No entanto, a estratégia mais estudada é a terapêutica genética. Esta patologia é uma óptima candidata a este tipo de terapêutica pois, apesar da heterogeneidade genética, a ACL tem uma causa monogenética e o olho em si apresenta muitas vantagens anatómicas e fisiológicas para a administração da terapêutica genética e avaliação dos seus resultados. Já foram realizados vários ensaios clínicos de primeira fase em humanos, não tendo sido detectados efeitos adversos graves desta terapêutica. Em termos de eficácia terapêutica, houve uma consistência no ganho de uma maior percepção luminosa e capacidade de navegar em ambientes pouco iluminados. No entanto a eficácia foi menor em termos de

melhoria da acuidade visual. Os efeitos da terapêutica parecem manter-se estáveis durante três anos, todavia o progresso da degeneração retiniana não é alterado.

Tendo em conta os resultados obtidos, podemos concluir que é necessário refinar a abordagem terapêutica para obter uma maior eficácia na melhoria da acuidade visual, desenvolver estratégias que preservem as estruturas da retina assim como realizar a terapêutica em doentes com mutações noutros genes.

Referências Bibliográficas:

1. Bainbridge JW, Smith AJ, Barker SS, Robbie S, Henderson R, Balaggan K, et al, Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis, N Engl J Med. 2008 May 22;358(21):2231-9.
2. Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, Pugh EN Jr, Mingozzi F, Bennicelli J, et al, Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis N Engl J Med. 2008 May 22;358(21):2240-8.
3. den Hollander AI, Roepman R, Koenekoop RK, Cremers FP, Leber congenital amaurosis: genes, proteins and disease mechanisms., Prog Retin Eye Res, 2008 Jul;27(4):391-419
4. Weleber RG, Francis PJ, Trzupek KM, Beattie C, MS, Leber Congenital Amaurosis. In Pagon RA, Adam MP, Bird TD, et al., editors. GeneReviewsR [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2014
5. Hufnagel RB, Ahmed ZM, Corrêa ZM, Sisk RA, Gene therapy for Leber congenital amaurosis: advances and future directions, Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2012 Aug;250(8):1117-28.
6. Corton M, Avila-Fernandez A, Vallespin E, López-Molina MI, Almoguera B, Martin-Garrido E et al, Involvement of LCA5 in Leber congenital amaurosis and retinitis pigmentosa in the Spanish population., Ophthalmology. 2014 Jan;121(1):399-407
7. Koenekoop RK, An overview of Leber congenital amaurosis: a model to understand human retinal development, Surv Ophthalmol. 2004 Jul-Aug;49(4):379-98.
8. Koenekoop RK, Loyer M, Dembinska O, Beneish R, Visual improvement in Leber congenital amaurosis and the CRX genotype, Ophthalmic Genet. 2002 Mar;23(1):49-59.
9. Chung DC, Traboulsi EI, Leber congenital amaurosis: clinical correlations with genotypes, gene therapy trials update, and future directions, J AAPOS. 2009 Dec;13(6):587-92.
10. Cremers FP, van den Hurk JA, den Hollander AI, Molecular genetics of Leber congenital amaurosis, Hum Mol Genet. 2002 May 15;11(10):1169-76.
11. Fazzi E, Signorini SG, Scelsa B, Bova SM, Lanzi G, Leber's congenital amaurosis: an update, Eur J Paediatr Neurol. 2003;7(1):13-22.

12. Online Mendelian Inheritance in Man®, [Online]. 2014 Mar 31, Acessível a partir: URL: <http://omim.org/>
13. Peshenko IV, Olshevskaya EV, Yao S, Ezzeldin HH, Pittler SJ, Dizhoor AM, Activation of retinal guanylyl cyclase RetGC1 by GCAP1: stoichiometry of binding and effect of new LCA-related mutations, *Biochemistry*. 2010 Feb 2;49(4):709-17.
14. Jacobson SG, Cideciyan Av, Peshenko IV, Sumaroka A, Olshevskaya EV, Cao L et al, Determining consequences of retinal membrane guanylyl cyclase (RetGC1) deficiency in human Leber congenital amaurosis en route to therapy: residual cone-photoreceptor vision correlates with biochemical properties of the mutants., *Hum Mol Genet* 2013 Jan 1;22(1):168-83.
15. Guyton AC, Hall JE, Textbook of medical physiology, 10th ed, Philadelphia, W. B. Saunders Company, 2001. p. 578-82.
16. Kannabiran C, Palavalli L, Jalali S, Mutation of SPATA7 in a family with autosomal recessive early-onset retinitis pigmentosa, *J Mol Genet Med*. 2012;6:301-3.
17. Pennesi ME, Stover NB, Stone EM, Chiang PW, Weleber RG, Residual electroretinograms in young Leber congenital amaurosis patients with mutations of AIPL1, *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011 Oct 17;52(11):8166-73.
18. Kuznetsova T, Zangerl B, Aguirre GD, RPGRIP1 and cone-rod dystrophy in dogs, *Adv Exp Med Biol*. 2012;723:321-8.
19. Røvsing L, Clokie S, Bustos DM, Rohde K, Coon SL, Litman T, et al, Crx broadly modulates the pineal transcriptome, *J Neurochem*. 2011 Oct;119(2):262-74.
20. Bujakowska K, Audo I, Mohand-Saïd S, Lancelot ME, Antonio A, Germain A, Lévillard T, Letexier M, Saraiva JP, Lonjou C, Carpentier W, Sahel JA, Bhattacharya SS, Zeitz C, CRB1 mutations in inherited retinal dystrophies, *Hum Mutat*. 2012 Feb;33(2):306-15.
21. Koenekoop RK, Wang H, Majewski J, Wang X, Lopez I, Ren H, Chen Y, Mutations in NMNAT1 cause Leber congenital amaurosis and identify a new disease pathway for retinal degeneration, *Nat Genet*. 2012 Sep;44(9):1035-9.

22. Perrault I, Hanein S, Zanolghi X, Serre V, Nicouveau M, Defoort-Delhemmes S, Mutations in NMNAT1 cause Leber congenital amaurosis with early-onset severe macular and optic atrophy, *Nat Genet.* 2012 Sep;44(9):975-7.
23. Drivas TG, Holzbaur EL, Bennett J, Disruption of CEP290 microtubule/membrane-binding domains causes retinal degeneration, *J Clin Invest.* 2013 Oct 1;123(10):4525-39.
24. Boye SE, Huang WC, Roman AJ, Sumaroka A, Boye SL, Ryals RC et al, Natural History of Cone Disease in the Murine Model of Leber Congenital Amaurosis Due to CEP290 Mutation: Determining the Timing and Expectation of Therapy, *PLoS One.* 2014 Mar 26;9(3):e92928.
25. McGrew DA, Hedstrom L, Towards a pathological mechanism for IMPDH1-linked retinitis pigmentosa, *Adv Exp Med Biol.* 2012;723:539-45.
26. Cheng CL, Molday RS, Changes in gene expression associated with retinal degeneration in the rd3 mouse, *Mol Vis.* 2013 May 6;19:955-69
27. Mackay DS, Dev Borman A, Moradi P, Henderson RH, Li Z, Wright GA, et al, DH12 retinopathy: novel mutations and phenotypic description, *Mol Vis.* 2011;17:2706-16.
28. Amengual J, Golczak M, Palczewski K, von Lintig J, Lecithin:retinol acyltransferase is critical for cellular uptake of vitamin A from serum retinol-binding protein, *J Biol Chem.* 2012 Jul 13;287(29):24216-27.
29. Dev Borman A, Ocaka LA, Mackay DS, Ripamonti C, Henderson RH, Moradi P, et al, Early onset retinal dystrophy due to mutations in LRAT: molecular analysis and detailed phenotypic study, *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012 Jun 22;53(7):3927-38.
30. Ajmal M, Khan MI, Micheal S, Ahmed W, Shah A, Venselaar H, et al, Identification of recurrent and novel mutations in TULP1 in Pakistani families with early-onset retinitis pigmentosa, *Mol Vis.* 2012;18:1226-37.
31. Sergouniotis PI, Davidson AE, Mackay DS, Li Z, Yang X, Plagnol V, et al, Recessive mutations in KCNJ13, encoding an inwardly rectifying potassium channel subunit, cause leber congenital amaurosis, *Am J Hum Genet.* 2011 Jul 15;89(1):183-90.

32. Asai-Coakwell M, March L, Dai XH, Duval M, Lopez I, French CR, et al, Contribution of growth differentiation factor 6-dependent cell survival to early-onset retinal dystrophies, *Hum Mol Genet.* 2013 Apr 1;22(7):1432-42.
33. Stone EM, Cideciyan AV, Aleman TS, Scheetz TE, Sumaroka A, Ehlinger MA, et al, Variations in NPHP5 in patients with nonsyndromic leber congenital amaurosis and Senior-Loken syndrome, *Arch Ophthalmol.* 2011 Jan;129(1):81-7.
34. Walter P, Implants for Artificial Vision, *Expert Rev Ophthalmol.* 2009;4(5):515-523.
35. Ma H, Thapa A, Morris L, Redmond TM, Baehr W, Ding XQ, Suppressing thyroid hormone signaling preserves cone photoreceptors in mouse models of retinal degeneration, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Mar 4;111(9): 3602-7.
36. Perusek L, Maeda T, Vitamin A derivatives as treatment options for retinal degenerative diseases, *Nutrients.* 2013 Jul 12;5(7):2646-66.
37. Cideciyan AV, Aleman TS, Boye SL, Schwartz SB, Kaushal S, Roman AJ, et al, Human gene therapy for RPE65 isomerase deficiency activates the retinoid cycle of vision but with slow rod kinetics, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Sep 30;105(39):15112-7.
38. Hauswirth WW, Aleman TS, Kaushal S, Cideciyan AV, Schwartz SB, Wang L, et al, Treatment of leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: short-term results of a phase I trial, *Hum Gene Ther.* 2008 Oct;19(10):979-90.
39. Maguire AM, High KA, Auricchio A, Wright JF, Pierce EA, Testa F, et al, Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial, *Lancet.* 2009 Nov 7;374(9701):1597-605.
40. Colella P, Auricchio A, Gene therapy of inherited retinopathies: a long and successful road from viral vectors to patients, *Hum Gene Ther.* 2012 Aug;23(8):796-807.
41. Zaneveld J, Wang F, Wang X, Chen R, Dawn of ocular gene therapy: implications for molecular diagnosis in retinal disease, *Sci China Life Sci.* 2013 Feb;56(2):125-33.
42. Willett K, Bennett J, Immunology of AAV-Mediated Gene Transfer in the Eye, *Front Immunol.* 2013 Aug 30;4:261.

43. Batten ML, Imanishi Y, Tu DC, Doan T, Zhu L, Pang J, et al, Pharmacological and rAAV gene therapy rescue of visual functions in a blind mouse model of Leber congenital amaurosis, *PLoS Med.* 2005 Nov;2(11):e333.
44. Pawlyk BS, Bulgakov OV, Liu X, Xu X, Adamian M, Sun X, et al, Replacement gene therapy with a human RPGRIP1 sequence slows photoreceptor degeneration in a murine model of Leber congenital amaurosis, *Hum Gene Ther.* 2010 Aug;21(8):993-1004.
45. Ku CA, Chiodo VA, Boye SL, Goldberg AF, Li T, Hauswirth WW, et al, Gene therapy using self-complementary Y733F capsid mutant AAV2/8 restores vision in a model of early onset Leber congenital amaurosis, *Hum Mol Genet.* 2011 Dec 1;20(23):4569-81.
46. Boye SL, Peshenko IV, Huang WC, Min SH, McDoom I, Kay CN, et al, AAV-mediated gene therapy in the guanylate cyclase (RetGC1/RetGC2) double knockout mouse model of Leber congenital amaurosis, *Hum Gene Ther.* 2013 Feb;24(2):189-202.
47. Molday LL, Djajadi H, Yan P, Szczygiel L, Boye SL, Chiodo VA, et al, RD3 gene delivery restores guanylate cyclase localization and rescues photoreceptors in the Rd3 mouse model of Leber congenital amaurosis 12, *Hum Mol Genet.* 2013 Oct 1;22(19):3894-905.
48. Watanabe S, Sanuki R, Ueno S, Koyasu T, Hasegawa T, Furukawa T, Tropisms of AAV for subretinal delivery to the neonatal mouse retina and its application for in vivo rescue of developmental photoreceptor disorders, *PLoS One.* 2013;8(1):e54146.
49. Al-Saikhani FI, The gene therapy revolution in ophthalmology, *Saudi J Ophthalmol.* 2013 Apr;27(2):107-111.
50. Simonelli F, Maguire AM, Testa F, Pierce EA, Mingozzi F, Bennicelli JL, et al, Gene therapy for Leber's congenital amaurosis is safe and effective through 1.5 years after vector administration, *Mol Ther.* 2010 Mar;18(3):643-50.
51. Cideciyan AV, Hauswirth WW, Aleman TS, Kaushal S, Schwartz SB, Boye SL, et al, Vision 1 year after gene therapy for Leber's congenital amaurosis, *N Engl J Med.* 2009 Aug 13;361(7):725-7.
52. Testa F, Maguire AM, Rossi S, Pierce EA, Melillo P, Marshall K, et al, Three-year follow-up after unilateral subretinal delivery of adeno-associated virus in

patients with Leber congenital Amaurosis type 2, *Ophthalmology*. 2013 Jun;120(6):1283-91.

53. Cideciyan AV, Jacobson SG, Beltran WA, Sumaroka A, Swider M, Iwabe S, et al, Human retinal gene therapy for Leber congenital amaurosis shows advancing retinal degeneration despite enduring visual improvement, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Feb 5;110(6):E517-25.